

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kernhaltige rote Blutzellen als prognostischer Indikator
bei kritisch kranken Hunden

von Maximiliane Müller

aus Salzburg

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere
Medizinische Kleintierklinik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess

Mitbetreuung durch: Dr. med. vet. René Dörfelt

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Harmut Gerhards

Tag der Promotion: 31.01.2015

für meine Mama

INHALTSVERZEICHNIS

KERNHALTIGE ROTE BLUTZELLEN ALS PROGNOSTISCHER INDIKATOR BEI KRITISCH KRANKEN HUNDEN.....	I
KERNHALTIGE ROTE BLUTZELLEN ALS PROGNOSTISCHER INDIKATOR BEI KRITISCH KRANKEN HUNDEN.....	II
INHALTSVERZEICHNIS.....	I
TABELLENVERZEICHNISS.....	IV
I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Rubrizyten	3
1.1. Defintion und Nomenklatur	3
1.2. Regulation und Reifungsprozess.....	5
1.3. Pathophysiologie	6
2. Bedeutung von kernhaltigen Erythrozyten als prognostischer Indikator in der Humanmedizin.....	7
3. Bedeutung von kernhaltigen Erythrozyten als prognostischer Indikator in der Veterinärmedizin.....	11
4. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)	12
5. Scoringssysteme in der Intensivmedizin	14
5.1. Scoringssysteme in der Humanmedizin.....	14
5.2. Scoringssysteme in der Verterinärmedizin	17
III. PUBLIKATION.....	20
1. Introduction	22
2. Material and Methods.....	24
3. Statistical analysis	25
4. Results	26
5. Discussion.....	27

6. Limitations of the study	29
7. References	31
IV. DISKUSSION.....	35
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	44
VI. SUMMARY	46
VII. LITERATURVERZEICHNIS.....	47
VIII. ANHANG.....	55
IX. DANKSAGUNG	56

Abkürzungsverzeichnis

ASA	American Society of Anesthesiologist
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluations
APPLE	Acute Patient Physiologic Laboratory Evaluation
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluations
APPLE	Acute Patient Physiologic Laboratory Evaluation
bzw.	beziehungsweise
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
EPO	Erythroproetin
HKT	Hämatokrit
ICU	Intensive care unit
IL-1	Interleukin 1
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
MPM	Mortality Predicting Model
NRBC	Nucleated red blood cell
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SPI	Survival Prediction Index
RNS	Ribonukleinsäure
WBC	White blood cells
z. B.	Zum Beispiel

TABELLENVERZEICHNISS

Tabelle 1: Vergleich der Mortalität von Normoblasten positiven und negativen Patienten. 9

Tabelle 2: In der Veterinärmedizin beschriebene SIRS Kriterien 13

Tabelle 3: Parameter, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ankunft in die ICU erhoben werden (KING et al., 2001b) 16

Tabelle 4: Parameter, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ankunft in die ICU erhoben werden (KING et al., 2001b) 18

Tabelle 5: Parameter des APPLE (HAYES et al., 2011) 19

I. EINLEITUNG

Kernhaltige rote Blutzellen, auch Rubrizyten genannt, sind Vorläuferzellen der Erythrozyten und werden im Knochenmark gebildet (TAVASSOLI, 1975). Physiologischerweise sind sie, mit Ausnahme von Neonaten, nicht im peripheren Blut von Erwachsenen zu finden (STACHON et al., 2001). Im peripheren Blut von Hunden sind Rubrizyten selten zu sehen. Die Ausnahme stellen Zwergschnauzer und Dackel dar, bei denen Rubrizyten ohne zugrundeliegende Erkrankung im peripheren Blut gefunden werden können (MEYER & HARVEY, 1997; ZENKER & HIRSCHBERGER, 2006). Bei Hunden können Rubrizyten unter anderem bei sehr überstürzter Regeneration, wie es bei einer regenerativen Anämie der Fall ist, gefunden werden (MEYER & HARVEY, 1997; MISCHKE, 2006; ZENKER & HIRSCHBERGER, 2006; ZABOLOTZKY & WALKER, 2014). Rubrizyten werden in der bisherigen veterinärmedizinischen Literatur jedoch nicht als Indikator für eine regenerative Anämie beschrieben (ZENKER & HIRSCHBERGER, 2006). Des Weiteren können Rubrizyten bei Dysfunktionen der Milz und Knochenmarksschädigungen im peripheren Blut auftreten (MEYER & HARVEY, 1997; MISCHKE, 2006; ZENKER & HIRSCHBERGER, 2006; ZABOLOTZKY & WALKER, 2014). Der genaue Pathomechanismus ist jedoch bis heute nicht ganz geklärt (CONSTANTINO & COGIONIS, 2000).

In der Humanmedizin wird das Auftreten von Rubrizyten im peripheren Blut bei unterschiedlichen Erkrankungen gesehen und unabhängig von der Art der Erkrankung als negativ prognostischer Faktor gesehen (STACHON et al., 2001). Im Rahmen verschiedener Studien wurde im peripheren Blut von Patienten mit kardiothorakalen Eingriffen, Multiorganversagen, Verbrennungen, Stammzelltransplantationen und kardio-pulmonalen Krankheiten, die mit Hypoxie einhergehen, eine erhöhte Anzahl an Rubrizyten nachgewiesen. In der Veterinärmedizin gibt es bisher erst eine Studie, bei der die prognostische Bedeutung von Rubrizyten bei Hunden mit Hitzschlag, evaluiert wurde (AROCH et al., 2009). Bislang existiert keine Studie, die das periphere Blut von kritisch kranken Hunden mit unterschiedlichen Grunderkrankungen auf Rubrizyten untersucht hat. Des Weiteren ist nicht geklärt, ob das Auftreten von Rubrizyten im

peripheren Blut bei Hunden mit einer schlechten Prognose einhergeht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es das periphere Blut von kritisch kranken Hunden auf kernhaltige Erythrozyten zu untersuchen, um zu sehen inwiefern das Auftreten von Rubrizyten mit dem Verlauf und der Prognose der Erkrankung assoziiert werden kann.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Rubrizyten

Rubrizyten (synonym Normoblasten) sind kernhaltige Vorläuferzellen der Erythrozyten (TAVASSOLI, 1975). Das Auftreten von Rubrizyten beim erwachsenen Menschen ist als pathologisch zu sehen (SCHWARZT & STANSBURY, 1954). Bei Neugeborenen können physiologischerweise bis zum fünften Lebenstag Rubrizyten im peripheren Blut detektiert werden (NGUYEN & DIAMOND, 2000). Eine geringe Anzahl an Rubrizyten (<5 Rubrizyten/100 Leukozyten (WBC)) kann ohne zugrundeliegende Erkrankung im peripheren Blut von Zwergschnauzern und Dackeln gefunden werden (MEYER & HARVEY, 1997; ZABOLOTZKY & WALKER, 2014)

1.1. Defintion und Nomenklatur

Rubrizyten sind myelopoetische Vorläuferzellen und stammen von pluripotenten Stammzellen ab (MISCHKE, 2003). Myelopoetische Vorläuferzellen haben die Fähigkeit zur Bildung lympho-hämatopoetischer Zellen, die sich mit Hilfe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (Stammzellfaktoren, Interleukin 3 (IL-3), Insulin like growth faktor 1, Erythropoetin (EPO), Thrombopoetin) zu myeloiden, erythroiden und lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren (ENGELHARDT & BREVES, 2010; OLVER, 2010). Bei Hunden besiedeln die Stammzellen der Hämatopoese ab dem 40. Tag der Embryonalphase die Leber, wenig später die Milz, den Thymus und ab dem 45. Tag das Knochenmark (MISCHKE, 2003). Beim erwachsenen Organismus werden sie im Bereich der Ossa plana und Ossa longa gebildet (MISCHKE, 2003; ENGELHARDT & BREVES, 2010). Die Nomenklatur der Vorläuferzellen unterscheidet sich in Human- und Veterinärmedizin (OLVER, 2010). Autoren der Humanmedizin und manche Autoren in der Veterinärmedizin bezeichnen kernhaltige rote Blutzellen je nach Reifungsstadium als Proerythroblast, Makroblast, basophiler Normoblast, polychromatischer Normoblast und oxiphiler Normoblast (MISCHKE, 2003; OLVER, 2010). In der Veterinärmedizin scheinen sich hingegen die Bezeichnungen Rubrioblast, Prorubrizyt, basophiler Rubrizyt, polychromatischer

Rubrizyt und oxiphiler Rubriozyt durchzusetzen (LÖFFLER et al., 2004; ZENKER & HIRSCHBERGER, 2006; OLVER, 2010).

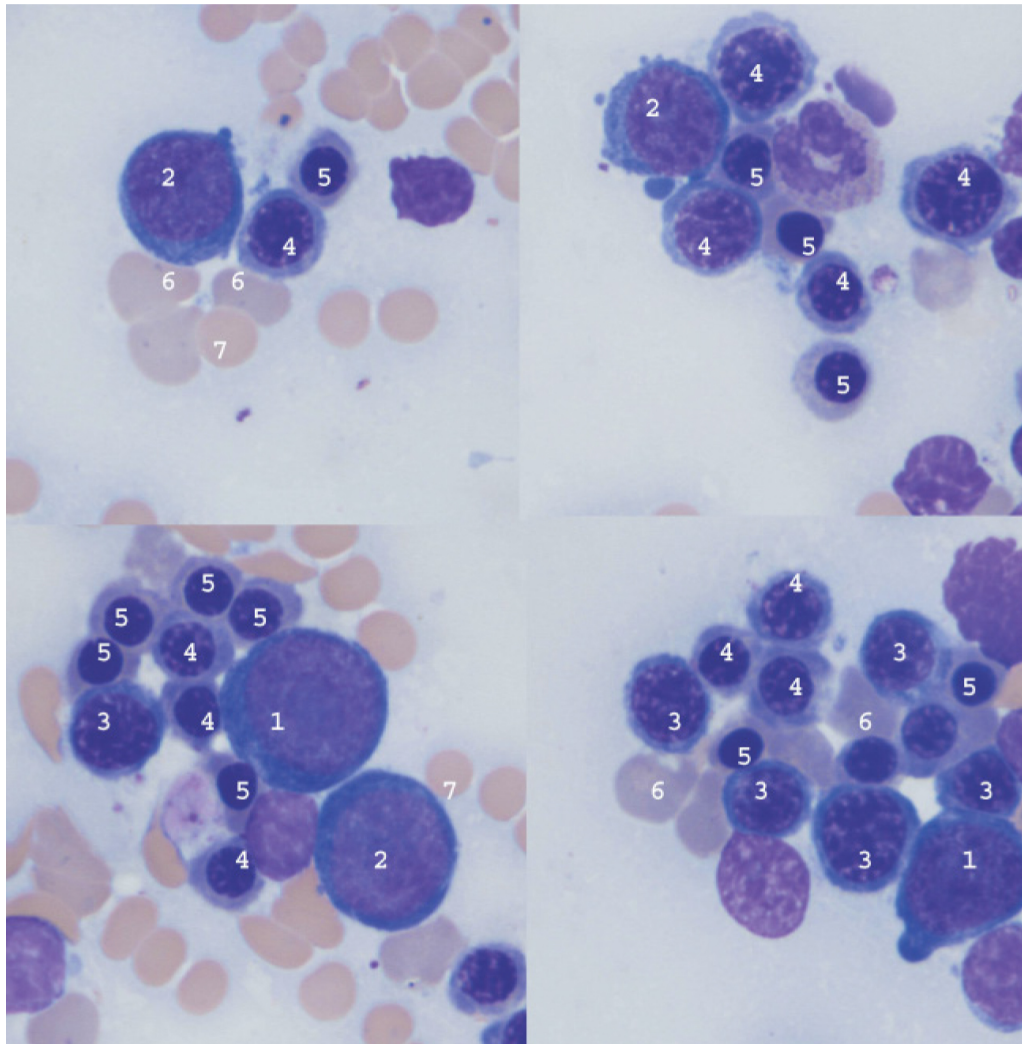


Abbildung 1: Reifungsstadien der Erythropoese (Schalms Veterinary Hematology 2010) (1) Rubriblast; (2) Prorubrizyt; (3) basophiler Rubrizyt; (4) polychromatischer Rubrizyt; (5) Metarubrizyt; (6) Retikulozyt; (7) Erythrozyt.

1.2. Regulation und Reifungsprozess

Die Erythropoese wird beim gesunden Tier durch den zellulären Sauerstoffgehalt geregelt (OLVER, 2010). Der entscheidende Regulator der Erythropoese ist das Erythropoetin (SIEGENTHALER, 2001; MISCHKE, 2003; SIBLERNAGL & DESPOPOULOS, 2003). Erythropoetin ist ein 30.400 Dalton Glykoprotein und wird von den peritubulären Zellen der Niere gebildet (ENGELHARDT & BREVES, 2010). Es beschleunigt die Reifung von Erythrozyten und fördert die Ausschleusung von Retikulozyten aus dem Knochenmark (MISCHKE, 2003). Die Erythropoietin-Synthese wird nicht über die Zahl der zirkulierenden Erythrozyten reguliert, sondern über den Sauerstoffpartialdruck (MISCHKE, 2003). Eine renale Dysfunktion oder Hypoxie führt zu einer erhöhten Synthese von Erythropoetin (MISCHKE, 2003; ENGELHARDT & BREVES, 2010). Während Hormone wie Kortikosteroide, Thyroxin, Androgen, Wachstumshormone, Prostaglandine den Erythropoietineffekt modulieren und verstärken, besitzen Interleukin-1, und Tumornekrosefaktor eine inhibitorische Wirkung auf Erythropoetin (MISCHKE, 2003).

Der Rubrioblast wird als früheste zytomorphologische Form der Erythropoese beschrieben (OLVER, 2010). Die Reifung zum Erythrozyten, der im peripheren Blut zu finden ist, läuft über mehrere Reifestufen (SIEGENTHALER, 2001; OLVER, 2010). Die Reifung ist durch eine zunehmende Kondensation des Kerns (schollige Verdichtung des Kernchromatins) und zunehmende Beladung des stets Granula freien Zytoplasmas mit Hämoglobin geprägt (MISCHKE, 2003; OLVER, 2010). Das Kern-Zytoplasma Verhältnis verschiebt sich mit Fortschreiten der Reifung immer mehr in Richtung Zytoplasma (LÖFFLER et al., 2004). Gleichzeitig nimmt der RNS-Gehalt ab und führt zu einem entsprechenden Farbwechsel von basophil zu eosinophil (MISCHKE, 2003; OLVER, 2010). Nach Ausschleusung des Kernes entsteht der jugendliche Erythrozyt, der Retikulozyt (MISCHKE, 2003). Die Ausreifung über die Zwischenstufen Rubrioblast, Prorubrizyt, basophiler Rubrizyt, polychromatischer Rubrizyt und oxiphiler Rubrizyt bis zum Retikulozyt dauert etwa vier Tage (MISCHKE, 2003). Nachdem der Kern ausgeschleust und von Knochenmarks Makrophagen aufgenommen wurde, kann der Retikulozyt das Knochenmark verlassen (OLVER, 2010).

1.3. Pathophysiologie

Unreife Zellen wie Rubrizyten können sich nicht verformen und somit physiologischerweise nicht das Sinusendothel des Knochenmarks durchdringen (CONSTANTINO & COGIONIS, 2000). Ihr Auftreten im peripheren Blut wird vor allem bei beeinträchtigter Knochenmarkbarriere oder bei extramedullärer Hämatopoese beobachtet. Die genauen Mechanismen, wie und warum es dazu kommt, sind noch nicht bekannt (CONSTANTINO & COGIONIS, 2000; STACHON et al., 2001).

Rubrizyten können bei überstürzter Regeneration im peripheren Blut auftreten, wie sie insbesondere bei der immunvermittelten, hämolytischen Anämie oder durch Angiopathien im Rahmen eines Hämangiosarkoms beobachtet wird; Rubrizyten werden jedoch nicht als zuverlässige Indikatoren für eine regenerative Anämie gesehen (MEYER & HARVEY, 1997; ZENKER & HIRSCHBERGER, 2006; ZABOLOTZKY & WALKER, 2014). Ursachen, die mit Beeinträchtigung des Knochenmarks einhergehen, wie eine Zerstörung des Knochenmarks durch Infiltration und Verdrängung (neoplastisch, fibrinös), oder eine Überlastung des Knochenmarks bei gesteigerter Regeneration, werden als Gründe für das Auftreten von Rubrizyten genannt (TAVASSOLI, 1975; MEYER & HARVEY, 1997; CONSTANTINO & COGIONIS, 2000; NGUYEN & DIAMOND, 2000). Zenker und Hirschberger et al. (2006) beschreiben eine Rubrizytenzahl von $>5/100$ Leukozyten als Indikator für eine Erkrankung des Knochenmarks, wie z. B. Hypoxie, myeloproliferative Erkrankungen und hochgradige Myelopoese. Eine Bleivergiftung, Eisen- und Kupfermangel sowie die hereditäre Makrozytose des Pudels werden als Ursachen für die irreguläre Freisetzung von Rubrizyten angeführt (MISCHKE, 2006; ZENKER & HIRSCHBERGER, 2006; ZABOLOTZKY & WALKER, 2014). Cowell et al., (1999) gehen bei >15 Rubrizyten/100 Leukozyten von einer massiven Schädigung der Knochenmarksbarriere aus. Bei einer Knochenmarks-Beeinträchtigung kann ebenso die Kapazität der Milz, deren Aufgabe es ist, die im peripheren Blut zirkulierenden Rubrizyten zu entfernen, überschritten werden (CONSTANTINO & COGIONIS, 2000). Bei einer Dysfunktion oder Entzündung der Milz, extramedullären Hämatopoese oder nach einer Splenektomie können erythrozytäre Vorläuferzellen ebenfalls im peripheren Blut detektiert werden

(TAVASSOLI, 1975; CONSTANTINO & COGIONIS, 2000; ZENKER & HIRSCHBERGER, 2006). Klinische Hinweise auf eine extramedulläre Hämatopoese stellen eine Splenomegalie und Hepatomegalie dar (CONSTANTINO & COGIONIS, 2000). Zu einer gesteigerten extramedullären Hämatopoese kann es durch eine Überlastung des Knochenmarks, wie bei einer schweren Form der Anämie, durch eine invasive Verdrängung (z.B. Leukämie) der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark und zu dessen Funktionsverlust, kommen (CONSTANTINO & COGIONIS, 2000). Leber und Milz übernehmen in diesem Fall hämatopoetische Funktionen, sind jedoch im Gegensatz zum Knochenmark nicht in der Lage unreife Zellen zurück zu halten. In der Humanmedizin wird eine Beeinträchtigung der Knochenmark-Blut-Barriere bei anderen schweren Erkrankungen wie Urämie, Sepsis, Hepatopathien und Hitzeschlag beschrieben (CONSTANTINO & COGIONIS, 2000). In der Veterinärmedizin beschrieben Autoren das Auftreten von Rubrizyten im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen, Trauma, Hyperadrenokortizismus und in Verbindung mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen (MEYER & HARVEY, 1997). Stachon et al. zeigten in einer Studie 2005 eine Korrelation von kernhaltigen roten Blutzellen im peripheren Blut und einem erhöhten Erythropoietingehalt mit IL-3 und IL-6 Konzentrationen beim Menschen. Die Autoren sehen daher einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Normoblasten im peripheren Blut und hypoxischen bzw. entzündlichen Zuständen (STACHON et al., 2005).

2. Bedeutung von kernhaltigen Erythrozyten als prognostischer Indikator in der Humanmedizin

Normoblasten werden mit einer Reihe von verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht und sind physiologischerweise nicht im peripheren Blut von Erwachsenen zu sehen (SCHWARZT & STANSBURY, 1954; TAVASSOLI, 1975). Das Auftreten von kernhaltigen roten Blutzellen im peripheren Blut wird, unabhängig von der Erkrankung, als Marker für eine schlechte Prognose gesehen (GROEN & GODFRIED, 1948; TAVASSOLI, 1975; KING et al., 1994; BÖNING et al., 2001; STACHON et al., 2001; LEHNHARDT et al., 2005; KUERT et al., 2011). Eine erhöhte Anzahl an Normoblasten im peripheren Blut wurde bisher bei Patienten nach kardiothorakalen Eingriffen (BÖNING et al.,

2001), Multiorganversagen (LESESVE et al., 2006), Verbrennungsopfern (LEHNHARDT et al., 2005), Patienten mit regenerativer Anämie (YOKOSE et al., 1994), Patienten mit Lungen/Herzerkrankungen (GROEN & GODFRIED, 1948) und einer dadurch bedingten Hypoxie (WARD & HOLMAN, 1967) sowie nach Stammzelltransplantation (OTSUBO et al., 2005) nachgewiesen. Das Auftreten von Normoblasten konnte nicht mit Nieren- oder Leberversagen assoziiert werden (STACHON et al., 2006a). Eine geringe Anzahl an Normoblasten kann bei Neonaten im peripheren Blut gefunden werden. Eine Anzahl von >10 NRBC/100 WBC wird bei Neugeborenen selten im peripheren Blut gesehen (SILLS & HADLEY, 1983; BOSKABADI et al., 2010). Mehr als 10 NRBC/100 WBC wird als möglicher Indikator für eine intrauterine Hypoxie bzw. perinatale Hypoxie vermutet (BOSKABADI et al., 2010). Boskabadi et al. (2010) sehen >13 NRBC/100 WBC als einen Indikator für eine schlechte Prognose mit einer Sensitivität von 81,3% und einer Spezifität von 94,4%. Littner et al., (2003) beschreiben NRBC im Blut von Neonaten als einen möglichen Marker für fetale Hypoxie. Asthma bei schwangeren Frauen könnte der Auslöser von fetaler Hypoxie sein, der genaue Einfluss auf den Fetus ist jedoch noch nicht geklärt (LITTNER et al., 2003).

Eine erhöhte Anzahl an Normoblasten bei Neugeborenen, die nicht innerhalb der ersten fünf Lebenstage sinkt, wird als negativer prognostischer Indikator bezüglich perinataler Komplikationen gesehen (KIL et al., 2011). Stachon et al. untersuchten im Rahmen von acht Studien das periphere Blut von stationären Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen auf Normoblasten und deren prognostische Bedeutung. Die Autoren beschreiben die positive Korrelation zwischen dem Auftreten von kernhaltigen Erythrozyten und einer erhöhten Mortalität. Bei einem transienten Auftreten von Normoblasten im peripheren Blut bleibt der Hinweis auf eine schlechte Prognose bestehen (STACHON et al., 2001). Die Mortalität steigt mit der Anzahl und der Dauer der Rubrizyten im peripheren Blut (STACHON et al., 2004). Autoren wie Stachon et al. und Otsubo et al. beschreiben einen signifikanten Anstieg der Mortalität bei einem Anstieg der Normoblasten auf $>200/\mu\text{l}$ (OTSUBO et al., 2005; STACHON et al., 2008). Als Indikator für einen fatalen Ausgang gilt eine Anzahl von $>2000/\mu\text{l}$ (STACHON et al., 2005). Eine Übersicht der Ergebnisse verschiedener Studien, welche einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von kernhaltigen Erythrozyten im

peripheren Blut mit der Mortalität der Patienten untersucht haben, gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Vergleich der Mortalität von Normoblasten positiven und negativen Patienten.

Autor	Jahr	Patienten
Stachon et al.	2001	Retrospektive Studie: Patienten nach Kardiothorakalen Eingriffen
Stachon et al.	2002	Stationäre Patienten aus allen Abteilungen
Stachon et al.	2004	Stationäre Patienten der ICU
Stachon et al.	2005	Stationäre Patienten der Chirurgischen ICU
Stachon et al.	2006	Patienten im Leber od. Nierenversagen
Stachon et al.	2007	Patienten der Internistischen ICU
Stachon et al.	2008	Reevaluierung von etablierten Risikoscores und Messung von NRBC bei Patienten der Chirurgischen ICU

Fortsetzung Tabelle 1: Vergleich der Mortalität von Normoblasten positiven und negativen Patienten.

Autor	Patientenzahl	Mortalität in %	Mortalität in %
		Normoblasten positive Patienten	Normoblasten negative Patienten
Stachon et al.	2074	45,6 %	3,0 %
Stachon et al.	4173	21,1 %	1,2 %
Stachon et al.	421	42,0 %	5,9 %
Stachon et al.	284	44,0 %	4,2 %
Stachon et al.	383	50,7 %	9,8 %
Stachon et al.	271	51,7 %	12,0 %

Das Reifestadium der Normoblasten scheint im Gegensatz zur Anzahl nicht entscheidend für die prognostische Aussagekraft zu sein (TAVASSOLI, 1975). Anhand dieser Studien kann eine Routinemessung der Normoblasten zu einer frühzeitigen Identifizierung von Patienten mit erhöhtem Mortalitätsrisiko beitragen (STACHON et al., 2002; LEHNHARDT et al., 2005). Die frühzeitige Erkennung dieser Patienten kann wiederum zu einer besseren Einschätzung und optimalen intensivmedizinischen Versorgung führen (STACHON et al., 2007).

3. Bedeutung von kernhaltigen Erythrozyten als prognostischer Indikator in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin gibt es im Gegensatz zur Humanmedizin erst eine Studie in der die Korrelation von Mortalität und Rubrizyten im peripheren Blut untersucht wurde. Aroch et al. (2009) untersuchte das periphere Blut von 40 Hunden mit Hitzschlag auf Rubrizyten. Aufgrund dieser Studie können Rubrizyten als Marker für sekundäre Komplikation, wie akutes Nierenversagen oder einer Disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC), bei Hunden mit Hitzschlag herangezogen werden (AROCH et al., 2009), da eine signifikant höhere Anzahl an Rubrizyten bei Hunden mit akutem Nierenversagen nach einem Hitzschlag gesehen werden konnte (AROCH et al., 2009). Vor Anstieg des Kreatinins kann der Kliniker so einen Hinweis auf ein akutes Nierenversagen bei Hunden mit Hitzschlag bekommen (AROCH et al., 2009). Die Autoren sehen Rubrizyten als einen nutzvollen prognostischen Indikator, der jedoch nie isoliert ohne weitere klinische Parameter betrachtet werden sollte (AROCH et al., 2009). Die Messung von IL-6 wird als wertvoller prognostischer Parameter bei Hunden mit SIRS und Sepsis erachtet (RAU S, 2009). Weitere Möglichkeiten zur Abschätzung des Schweregrads von Krankheiten und des Mortalitätsrisikos sind eigens dafür angefertigte Scoringsysteme (HAYES et al., 2010).

4. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)

SIRS steht für das klinische Bild einer generalisierten Entzündungsreaktion, welche zu einer Beeinträchtigung der Homöostase, des Gefäßtonus, der Endothelpermeabilität sowie der Aktivierung der Gerinnungskaskade führen kann (DE LAFORCADE, 2009). Der Begriff stammt aus der Humanmedizin und wurde 1992 auf der American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine Consensus Conference festgelegt (ACCP-SCCM, 1992). Ziel war es entzündliche Reaktionen, unabhängig von der Grunderkrankung, welche im Multioraganversagen enden können früh anhand klinischer Parameter zu erkennen. Als Voraussetzung für das Zustandekommen einer SIRS wird eine übermäßige Entzündungsreaktion und die Freisetzung spezieller Entzündungsmediatoren (TNF α , IL-1 und IL-6, Präkallikrein, Bradykinin und Plättchen-aktivierende Faktoren), welche im Rahmen einer infektiösen als auch nicht infektiösen Erkrankung freigesetzt werden können, gesehen. Wird die SIRS durch eine nachgewiesene Infektion hervorgerufen befindet sich der Patient per Definition in einer Sepsis (DE LAFORCADE, 2009). SIRS wird zwar in der Literatur häufig in Assoziation mit Sepsis beschrieben, kann jedoch auch im Rahmen nicht infektiöser Erkrankungen wie Hitzschlag, Pankreatitis, immunmedierte Erkrankungen, Neoplasie, Verbrennungen sowie bei Hunden mit Polytrauma auftreten (DE LAFORCADE, 2009). Folglich kann es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Patienten handeln, die sich alle in einem kritischen Stadium ihrer Erkrankung befinden. Als Einschlusskriterien werden klinische Parameter (Innere Körpertemperatur, Herzfrequenz pro Minute, Atemfrequenz pro Minute, Leukozytenanzahl sowie Anzahl der stabkernigen Leukozyten) herangezogen von denen, beim Hund mindestens zwei von vier erfüllt werden müssen. Abgeleitet aus der Humanmedizin werden in der Veterinärmedizin verschiedene Ansätze zur Definition von SIRS herangezogen (siehe Tabelle 2).

In einer Studie in der 30 septische Hunde und 320 nicht septische Hunde mit eingeschlossen wurden konnte eine hohe Sensitivität und Spezifität gefunden werden und wird daher von Autoren als die am besten geeigneten Kriterien (HAUPTMAN et al., 1997; DE LAFORCADE, 2009). Hierbei handelt es sich um eigens für den Hund evaluierte Kriterien, welche eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 64 % für das Vorliegen von SIRS ergaben (HAUPTMAN et

al., 1997). Die Entwicklung und Festlegung der SIRS Kriterien dienen der frühen Erkennung von kritischen Patienten sowie der damit verbundenen Prognose. In Hinblick darauf wurden in der Veterinärmedizin die Mortalität von Hund mit SIRS Kriterien im Vergleich zu Hunden ohne SIRS Kriterien untersucht. Hierbei konnte eine signifikant höhere Mortalität bei Hunden, die SIRS Kriterien erfüllten im Vergleich zu Hunden die keine SIRS Kriterien erfüllte gefunden werden (OKANO et al., 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden dass die Mortalität mit der Anzahl der SIRS Kriterien die erfüllt werden steigt (OKANO et al., 2002). In der Humanmedizin wird eine mehrtägig Bestimmung der SIRS Kriterien zur Einschätzung der Prognose herangezogen (KITAMURA et al., 1996) ähnlich wie bei denen, zur Einschätzung der Prognose entwickelten Scoringsystemen.

Tabelle 2: In der Veterinärmedizin beschriebene SIRS Kriterien

	Purvis& Kirby (1994)	Hardie (1995)	Hauptmann et al. (1997)	Brady& Otto (2001)	Okano (2014)
Temperatur (°C)	<38,8; >39,7	<38,0; >40,0	<38,1; >39,2	<38,0; >40,0	<37,8; >39,7
Herzfrequenz (/min)	>160	>120	>120	>120	>160
Atemfrequenz (/min)	>20	>20	>20	>40	>40
WBC (/μl)	<4000; >12000	>5000; >18000	<6000; >16000	<5000; >18000	<4000; >16000
LV %	>10	>5	>3		>10

LV: Linksverschiebung

5. Scoringsysteme in der Intensivmedizin

Scoringsysteme sind universell einsetzbare, krankheitsübergreifende Hilfsmittel zur besseren Abschätzung der Morbidität, der Mortalität und des damit einhergehenden therapeutischen Aufwandes (JUNGER et al., 2002).

5.1. Scoringsysteme in der Humanmedizin

Scoringsysteme finden in der Humanmedizin mehrere Anwendungsbereiche. Im Bereich Anästhesie und Intensivmedizin werden verschiedene Modelle genutzt. Das aufgrund seiner Einfachheit in der Anästhesie am häufigsten gebrauchte Modell ist die American Society of Anesthesiologists (ASA) Klassifizierung (JUNGER et al., 2002). Bei der ASA Klassifizierung, die 1905 von neun Humanmedizinern auf Long Island entwickelt wurde, wird der körperliche Zustand des einzelnen Patienten anhand Vorerkrankungen und des Allgemeinbefindens abgeschätzt (JUNGER et al., 2002). Im Bereich der Intensivmedizin konnten sich seit Beginn der frühen achtziger Jahre verschiedene Scoringsysteme etablieren (KNAUS, 2002). Den Beginn machte William Knaus 1981 als Pionier der Scoringsysteme mit der Entwicklung des Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE, Übersicht zu den Parametern gibt Tabelle 2) (KNAUS et al., 1981). Drei Jahre danach entwickelte Le Gall den Simplified Acute Physiology Score (SAPS, Übersicht zu den Parametern gibt Tabelle 2) (LE GALL et al., 1984). Beide Scoringsysteme wurden später noch einmal modifiziert. Auch 1995 von Lemeshow et al. Vorgestellte Mortality Predicting Model (MPM) wurde später modifiziert. Lemeshow und Le Gall teilen die Score- Entwicklung in der Intensivmedizin in drei Generationen auf. (LEMESHOW & LE GALL, 1994). In der ersten Generation kam es zu einer subjektiven Selektion der Scoring-Variablen und deren Gewichtung durch Experten (JUNGER et al., 2002). Die zweite Generation war geprägt durch die Vereinfachung, bereits bestehender Scoringsysteme (JUNGER et al., 2002). Scoringsysteme der dritten Generation zeichneten sich dadurch aus, dass eine Selektion der Variablen durch logistische Regression erfolgt.

Die Ergänzung der bereits etablierten Scoringsysteme wie APACHE 2 und SAPS 2 mit der täglichen Messung der Rubrizyten und deren prognostische Aussagekraft wäre, gemäß Autoren der Humanmedizin, eine sinnvolle

Erneuerung (STACHON et al., 2008).

Tabelle 3: Parameter, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ankunft in die ICU erhoben werden (KING et al., 2001b)

APACHE	SAPS
- Alter	- Alter
- Hämatokrit (l/l)	- Ursache für Einlieferung
- Zur Kenntnisnahme chronischer Erkrankungen	- Zur Kenntnisnahme chronischer Erkrankungen
- Glasgow Koma Skala	- Glasgow Koma Skala
- Mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg)	- Mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg)
- Herzfrequenz (1/min)	- Herzfrequenz (1/min)
- Atemfrequenz (1/min)	- Urinproduktion (1/min)
- Innere Körpertemperatur	- Innere Körpertemperatur
- Sauerstoffsättigung (%)	- Sauerstoffsättigung (%)
- pH – Wert	- Bikarbonat (mmol/l)
- Kreatinin (mg/dl)	- Kreatinin (mg/dl)
- Leukozyten (103/ μ l)	- Leukozyten (103/ μ l)
- Kalium (mg/dl)	- Kalium (mg/dl)
- Natrium (mg/dl)	- Natrium (mg/dl)
- Kreatinin (mg/dl)	
- Bilirubin (mg/dl)	

5.2. Scoringssysteme in der Veterinärmedizin

Im Vergleich zu der Vielzahl an Scoringssystemen in der Humanmedizin gibt es in der Veterinärmedizin erst einige wenige Scoringssysteme. Zu den bereits entwickelten Scoringssystemen zählen der Survival Prediction Index (SPI 1 und 2, Übersicht zu den Parametern gibt Tabelle 3) (KING et al., 1994) und der Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation (APPLE, Übersicht zu den Parametern gibt Tabelle 4) (HAYES et al., 2010)

Gemeinsam haben diese Scoringssysteme, dass mit Hilfe von objektiven Parametern der Schweregrad der körperlichen Beeinträchtigung und die damit verbundene Prognose evaluiert werden kann. Der Hintergrund, warum es zur Entwicklung solcher Modelle in der Veterinärmedizin gekommen ist, ist bei allen bisher entstanden Modellen der gleiche, nämlich die Kategorisierung von Patienten nach dem Schweregrad der Erkrankung (KING et al., 1994). Als wichtigster Vorteil dieser Kategorisierung wird in der Veterinärmedizin die bessere Beurteilung klinischer Studien gesehen (KING et al., 2001a). Alternative dazu ist die Durchführung von Studien mit Versuchstieren, die eine homogene Population darstellen, jedoch einige Nachteile mit sich bringt (KING, 2009). Der Erfolg aus klinischen Studien Schlussfolgerungen ziehen zu können, ist untrennbar mit der Homogenisierung der Patientenpopulation verbunden. Die Interpretation ist verfälscht, wenn zum Beispiel bei einer Medikamentenstudie die Probanden einen unterschiedlichen Grad einer bestimmten Erkrankung aufweisen. Eine weitere Indikation für Scoringssysteme ist die Einschätzung von Prognose und Mortalität für das Einzeltier (KING et al., 1994). Dies bietet Vorteile in der Anpassung einer adäquaten Therapie und Überwachung. Autoren wie KING 2001 raten jedoch davon ab, individuelle Entscheidung rein anhand von Scoringssystemen in der Veterinärmedizin zu treffen.

Tabelle 4: Parameter, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ankunft in die ICU erhoben werden (KING et al., 2001b)

SPI 1	SPI 2
- Alter	- Alter
- Gewicht	- Atemfrequenz (1/min)
- Innere Körpertemperatur	- Mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg)
- Herzfrequenz (1/min)	- Aufnahme über Innere Medizin/Chirurgie
- Atemfrequenz (1/min)	- Hämatokrit (%)
- Mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg)	- Kreatinin (mg/dl)
- Sauerstoffsättigung (%)	- Albumin (g/dl)
- Neurologischer Erkrankung J/N	
- Aufnahme über Innere Medizin/Chirurgie	
- Chronische Erkrankungen J/N (>3 Monate)	
- Hämatokrit (%)	
- Totalprotein (g/dl)	
- Glukose (mg/dl)	
- Leukozyten ($10^3/\mu\text{l}$)	
- Kreatinin (mg/dl)	
- Albumin (g/dl)	
- Bilirubin (mg/dl)	
- Bikarbonat (mmol/l)	

Tabelle 5: Parameter des APPLE (HAYES et al., 2011)

APPLE full	APPLE fast
- Alter	- Allgemeinverhalten
- Allgemeinverhalten	- Glukose (mg/dl)
- Atemfrequenz (1/min)	- Albumin (g/dl)
- Sauerstoffsättigung (%)	- Thrombozyten ($10^3/\mu\text{l}$)
- Freie Flüssigkeit in Körperhöhlen	- Laktat (mg/dl)
- Kreatinin (mg/dl)	
- Leukozyten ($10^3/\mu\text{l}$)	
- Albumin (g/dl)	
- Bilirubin (mg/dl)	
- Laktat (mg/dl)	

III. PUBLIKATION

Downloaded from veterinaryrecord.bmj.com on August 31, 2014 - Published by group.bmj.com

Paper

Paper

Association of nucleated red blood cells with mortality in critically ill dogs

M. Müller, R. Dörfelt, L. Hamacher, G. Wess

¹ Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

Keywords: prognosis, blood smear, rubricyte, survival

Corresponding Author: Gerhard Wess, DVM, PhD, Dipl. ACVIM (Cardiology), Dipl ECVIM-CA (Cardiology and Internal Medicine), Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig Maximilians University, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany, Email: gwess@lmu.de

The work was done at the Clinic of Small Animal Internal Medicine, Ludwig Maximilians University Munich, Germany

The study was not supported by a grant or otherwise.

An abstract of the study was presented at the 23rd European College of Veterinary Internal Medicine (ECVIM) congress 2013 in Liverpool.

Abstract

The occurrence of nucleated red blood cells (NRBCs) in the peripheral blood of critically ill human patients is associated with increased mortality. In dogs, the presence of NRBCs in peripheral blood has been used as a sensitive and specific marker of complications and outcome associated with heatstroke. However, no study has investigated their prevalence in critically ill dogs. Thus, the aim of this study was to determine the prevalence of NRBCs in the peripheral blood, and to evaluate their occurrence as a prognostic factor, in critically ill dogs. One-hundred-one dogs were prospectively included; the presence of NRBCs was studied on a daily basis from the time of admission until day 3 in the intensive care unit (or less if discharged or death occurred earlier). Dogs fulfilled at least two systemic inflammatory response syndrome (SIRS) criteria and suffered from various diseases. Survival was defined as being alive 28 days post discharge from hospital.

In 42 dogs, NRBCs were detected at least once; 59 patients were NRBC negative. Mortality was significantly higher in NRBC-positive than NRBC-negative patients (54.8% vs. 30.5%) ($p = 0.014$). However, this association was not present when anaemic dogs were excluded from the analysis. Detection of NRBCs in the peripheral blood may be an indicator for regenerative anaemia and may have potential for use as a prognostic tool or in addition to established scoring systems in critically ill dogs.

1. Introduction

Nucleated red blood cells (NRBCs) are immature erythrocytes produced in the bone marrow. All stages of the developing red blood cell (RBC) with the exception of reticulocytes and normocytes/erythrocytes can be classified as NRBCs (SCHWARZT and STANSBURY, 1954; MEYER and HARVEY, 1997). These cells are not normally present in the peripheral blood of healthy humans (TAVASSOLI, 1975; CONSTANTINO and COGIONIS, 2000) or dogs (NGUYEN and DIAMOND, 2000) beyond the neonatal period. The presence of NRBCs in the peripheral blood has been associated with regenerative anaemia in dogs, especially immune-mediated haemolytic anaemia (IMHA) (MEYER and HARVEY, 1997; MISCHKE, 2006). To date, there is no study that investigates the prevalence of NRBCs in the peripheral blood of anaemic dogs. Additionally, the occurrence of NRBCs has been reported in the peripheral blood of dogs with lead poisoning, with ferric and copper deficiency, and after splenectomy, as well as in poodles with inherited macrocytosis (MISCHKE, 2006). Recently, Aroch and co-workers showed that presence of peripheral NRBCs is a common phenomenon in dogs with heatstroke. Although in many disease states the precise causation of circulating nRBCs is unknown, many pathophysiologic mechanisms have been suggested to contribute, such as: presence of bone marrow stress; invasion or replacement of the bone marrow (leukaemia, metastatic infiltration, fibrosis); compensatory erythropoiesis and extramedullary haematopoiesis as a result of anaemia or hypoxia, with increased circulating NRBCs overwhelming the ability of a normal spleen to clear them from the circulation; and splenic dysfunction or splenectomy.

In humans, the occurrence of NRBCs in peripheral blood has been noted with a variety of illnesses, for example burn injuries, liver and kidney failure, multi organ dysfunction syndrome, hypoxemia, and perinatal asphyxia, as well as after cardiothoracic surgery and stem cell transplantation (BONING and others., 2001; STACHON and others., 2001; LEHNHARDT and others., 2005; LESESVE and others., 2006; STACHON, HOLLAND-LETZ and others., 2006; BOSKABADI and others., 2010; KIL and others., 2011).

The presence of NRBCs in the peripheral blood of humans is strongly associated

with increased mortality, independent of the primary disease (BONING and others., 2001; STACHON and others., 2001; LEHNHARDT and others., 2005; LESESVE and others., 2006; BOSKABADI and others., 2010; KIL and others., 2011). To date, only one study has assessed the prognostic value of NRBC numbers in dogs (AROCH and others., 2009). In that study, the number of peripheral NRBCs was determined in dogs suffering from heatstroke, and their presence was shown to be a sensitive and specific predictor of death and had high clinical correlation with secondary complications (AROCH and others., 2009). Hence, NRBCs might be a useful additional marker to calculate the risk of mortality in critically ill dogs.

Risk predictors and scoring systems (such as the acute physiology and chronic health evaluation (APACHE) and simplified acute physiology score (SAPS)) are used routinely in human critical care medicine to assess prognosis (LE GALL and others., 1984; GUNNING and ROWAN, 1999). Both in human and veterinary medicine, scoring systems are based on objective clinical and laboratory variables (HAYES and others., 2010; GOERTZ and others., 2011). Two scoring systems, the acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) and survival prediction index (SPI-2), have been validated for use in dogs and are considered useful in clinical practice, however perceptions of their appropriate use vary (KING and others., 2001; HAYES and others., 2010; LANGHORN and others., 2013). The 10-variable score (APPLE full) optimises predictive accuracy. If certain laboratory and clinical data are lacking, as was in some of the dogs in the present study, the 5-variable model (APPLE fast) can be used (HAYES and others., 2010).

An objective prognostic factor for mortality, which is easy to determine for the attending veterinarian, would be useful for an effective owner communication and patient monitoring. The aim of this study was to investigate the prevalence of NRBCs in critically ill dogs and to evaluate the presence of NRBCs in the peripheral blood as a prognostic factor in critically ill dogs. The study hypothesis was that the occurrence of NRBCs in the peripheral blood of critically ill dogs is associated with increased mortality.

2. Material and Methods

Over a 1 year period, from June 2011 to July 2012, all dogs either been presented directly to the emergency service or transferred in-house to the intensive care unit (ICU) of the Small Animal Hospital, were prospectively included. The study was approved by the University Research and Ethics Committee.

Dogs had to fulfil at least two of the following criteria defining the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) to be included: heart rate >120 beats/min; respiratory rate >20 breaths/min; rectal core temperature <38°C or >39.2°C; and white blood cell count (WBC) <6 × 10³/μL or >16 × 10³/μL, or band neutrophils >3% (HAUPTMAN and others., 1997). Dogs were excluded if they were euthanased for reasons not related to the underlying disease e.g. financial constraints. Patients presented with disorders predisposing to the appearance of NRBCs (anaemia, immune mediated haemolytic anaemia (IMHA), and spleen disorders) in the peripheral blood were categorised in subgroups. Dogs with a reticulocyte count below 60,000 /μL were classified as non-regenerative and dogs with a reticulocyte count exceeding 60,000 /μL were classified as regenerative. At admission, all dogs underwent a physical examination followed by blood sampling for the determination of baseline haematological and biochemical parameters, including NRBC analysis (see below). Clinical outcome was categorised as survival to 28 days after discharge from hospital or non-survival (died or euthanased). The 28-day follow-up was conducted by phone interview.

Blood samples were collected daily until day 3 or until discharge from the ICU from peripheral (cephalic or saphenous) veins (initially during catheter placement) or from a central venous catheter where available. Samples were immediately transferred to EDTA and heparin/serum tubes for routine analysis (serum biochemistry profile (Cobas Integra 400 Plus; Roche Diagnostics GmbH, Switzerland), complete blood count, reticulocyte count (Sysmex XT-2000i; Sysmex Deutschland GmbH Bornbach, Norderstedt, Germany), blood gas and electrolyte analysis (Rapidpoint; Siemens AG, Munich, Germany), lactate (Accutrend Plus; Cobas Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Germany) as deemed necessary by the attending clinician. Additionally, EDTA blood was used to prepare several fresh blood smears. These were used to determine the presence and number of NRBCs manually as described in previous studies (LEHNHARDT and others., 2005; AROCH and others., 2009; KIL and others., 2011): NRBC numbers were assessed manually for each patient using microscopic examination of a Diff-Quik stained blood smear (Diff-Quik Fix; Medion Diagnostics AG, Dürdingen, Switzerland). This was performed by a single trained clinician, who was blinded towards the dog's condition and physical examination findings. One hundred nucleated cells were examined for the presence of NRBCs using 1000× magnification. The number of NRBCs within a one hundred nucleated cell count was recorded to give a relative NRBC count (rNRBC). All other nucleated cells were leukocytes. Absolute NRBC (aNRBC) numbers were calculated from those values as follows: $aNRBC = rNRBC \times (WBC/100)$. The corrected WBC count was consequently $WBC - aNRBC$ (WILLARD & TVEDTEN 1994). Based on the parameters available in all dogs, an APPLE fast score was calculated retrospectively. All parameters were assessed over the first 24 h following ICU admission. APPLE fast was calculated by summing the value of five previously determined parameters (glucose, albumin, lactate, platelet count, and mentation score) (HAYES and others., 2010).

3. Statistical analysis

Results were analysed using a statistical software package (SPSS 14.0; Chicago, Illinois, USA). Normality was tested with the Kolmogorov–Smirnov test. Normally distributed data were presented as mean \pm standard deviation (SD). Data not normally distributed were presented as median (m) and interquartile range

(IQR). Intergroup comparison was performed using an unpaired *t* test and a chi-square test. Correlation was tested with the Pearson test and reported as *r*. *P*-values of <0.05 were considered significant.

4. Results

One hundred one dogs with a median (m) age of 86.0 months (IQR 31–114) and median weight of 21.0 kg (IQR 9.80–31) fulfilled the inclusion criteria. There were 40 spayed female, 31 entire male, 18 entire female, and 12 castrated male dogs. The most common breeds included the mixed breed (24), Yorkshire Terrier (5), Golden Retriever (4), Rottweiler (4), Doberman (4), and Beagle (4). Other breeds were represented with less than four individuals in the study. Median duration of the underlying disease was 1 day (IQR 0–5), and median duration of hospitalisation was 3 days (IQR 1–5). Clinical parameters at presentation were as follows: median heart rate, 148 beats/min (IQR 120–160); median respiratory rate, 42 breaths/min (IQR 32–54); and median rectal temperature, 39.0°C (IQR 38.5–39.6). Thirty-seven dogs fulfilled 2/4 criteria only, 49 dogs fulfilled at total 3/4 criteria and 15 dogs fulfilled all 4 SIRS criteria. Underlying diseases were infectious (*n* = 30), neoplastic (*n* = 20), immune-mediated (*n* = 8), metabolic (*n* = 7), and miscellaneous (*n* = 36).

One, two or three blood samples to assess NRBC were obtained from 29, 24, 48 dogs respectively. Analysing all NRBC-positive samples, no correlation with a correlation coefficient (*r*) of >0.5 was found to any of the haematological parameters (white blood cells (WBC), packed cell volume (PCV), reticulocytes).

Sixty dogs were alive at the end of the study period, whereas 8 dogs died during hospitalisation and 33 were euthanased within 28 days after presentation. During their stay in the ICU, 42 of 101 dogs were NRBC positive and 59 dogs were negative, demonstrating a prevalence of 41.5% for the appearance of NRBCs in this population. Six of the dogs which were NRBC positive on the first day became NRBC negative on the consecutive days and 10 of the initial NRBC negative at day one became positive.

Mortality of the NRBC-positive dogs (54.8%) was significantly higher compared to that of the NRBC-negative dogs (30.5%) (*p* = 0.014). The APPLE fast score of the NRBC-positive dogs (25.36 ± 5.28) did not differ from that of the NRBC-

negative dogs (25.39 ± 4.98 ; $p = 0.975$).

The subgroup of dogs with regenerative anaemia ($n = 16$), which was also included in the main study population was examined separately afterwards. Within this group, 7 dogs had IMHA ($n = 7$) and 4 dogs suffered from diseases with direct involvement of the spleen (haemangiosarcoma, $n = 3$; other splenic neoplasia, $n = 1$). Fifteen out of these 16 anaemic dogs were NRBC positive at least once during their stay in ICU, 12 of which did not survive until the end of the study. Of 20 dogs with non-regenerative anaemia, 7 were NRBC positive and 13 were NRBC negative, 11 of which survived until the end of the study.

NRBCs were more often seen in dogs with regenerative anaemia (15/16) than in those with non-regenerative anaemia (7/20) ($p = 0.001$). Of the 65 critically ill dogs without anaemia, 20 were NRBC positive and 45 NRBC negative. In this group (dogs with anaemia excluded), there was no difference in mortality between NRBC positive (30%) and NRBC negative dogs (28.9%; $p = 0.928$). The highest mortality (80%) was seen in NRBC-positive dogs with regenerative anaemia.

5. Discussion

NRBCs are used as a negative prognostic marker in humans with critical illnesses; however, there is a paucity of information regarding their prognostic value in other species, including dogs. In the present study, the authors investigated the prevalence of the presence of NRBCs in the peripheral blood of critically ill dogs and found it overall to be lower (41.5%) compared with the only available publication to date investigating their occurrence in veterinary patients (AROCH and others., 2009). However, in this study, a focussed population of dogs with a single disease (heatstroke) was investigated, which might explain the high incidence of NRBCs detected in the peripheral blood (90%). The authors speculated that a thermal injury to the bone marrow during heatstroke caused premature NRBC release into the peripheral blood. Both the manuscript from Aroch and co-workers and the data presented in the present study show a higher prevalence of NRBCs in critically ill dogs compared with humans, where a prevalence from 7.5% to 32% is reported (STACHON and others., 2002; STACHON and others., 2004; STACHON, KEMPF, and others., 2006; STACHON and others., 2007). An increased incidence could be found in people

treated in an ICU setting; in this population, the detection of NRBCs was associated with severely increased in-hospital mortality rates (STACHON and others., 2002).

With regard to the canine population investigated in the present study, a significantly higher mortality rate of NRBC-positive (54.8%) patients compared with NRBC-negative (30.5%) patients was shown. The mortality rate of NRBC-positive dogs is similar to data from human patients, where mortality rates of 21.1%–56.6% for NRBC-positive patients has been reported (STACHON and others., 2002; LEHNHARDT and others., 2003; STACHON and others., 2004; STACHON and others., 2007).

The retrospective calculation of a validated objective risk stratification model, showed that there was no difference in APPLE fast scores between NRBC-positive and NRBC-negative canine patients. This could be due to the fact that the APPLE score was only calculated once for each dog (on the day of admission to the ICU). Hence, it is possible that maximum scores of dogs were underestimated, as they could have increased during subsequent days of hospitalisation. A possible contribution of NRBCs to the APPLE fast was not investigated, but could be an interesting topic for further studies.

Although mortality was marginally higher in NRBC-positive than NRBC-negative dogs after exclusion of anemic dogs, this difference was not significant. The fact that after exclusion of anemic dogs mortality was not anymore significantly higher in NRBC positive dogs may mean NRBC are not a useful prognostic factor and has to be evaluated in further studies.

It is notable that previous reports described an increased incidence of NRBC in dogs with regenerative anaemia and extramedullary haematopoiesis, but did not report an increased incidence in dogs with non-regenerative anaemia (MEYER and HARVEY, 1997; MISCHKE, 2006). The present study, however, showed a higher incidence of NRBCs in the peripheral blood of all dogs with anaemia, compared with other critically ill dogs that were not anemic. Whereas we found NRBCs in regenerative and in non-regenerative anaemia, the incidence was especially high with regenerative anaemia, as all but one dog with regenerative anaemia were NRBC positive in the present study.

Veterinary (COWELL and others., 1999) and human literature (SCHWARZT and STANSBURY, 1954; CONSTANTINO and COGIONIS, 2000) have described lack of physiologic splenic function to be associated with the appearance of NRBC in peripheral blood. Three of the dogs in the studied population had splenic neoplasia and two of these dogs were NRBC negative. It has to be mentioned that, because of the invasive character of this diagnostic test, we did not exclude neoplastic invasion of the bone marrow, which could predispose dogs to NRBC in the peripheral blood.

The underlying pathophysiology of NRBCs in blood is not fully understood. Analysis of the cytokine profile in the blood of human NRBC-positive patients suggests that NRBCs may be considered a parameter that correlates with hypoxic or inflammatory injury (STACHON and others., 2003). In the present study, NRBC-count did not correlate with the white blood cell count; however, no investigation was performed of known inflammatory markers (like C-reactive protein) or cytokine levels.

6. Limitations of the study

Limitations of the study included the manual technique for the quantification of NRBCs—an imprecise technique for the quantification of concentrations less than 200/ μ L (STACHON and others., 2002). Patients with peripheral NRBC counts of less than 200/ μ L might have been missed in the present study. The determination of aNRBC revealed only low NRBCs counts and therefore dogs were only categorised as NRBC positive or negative; subsequently, a cut-off point for NRBC count and sensitivity and specificity for mortality could not be determined. Daily analysis of NRBCs in critically ill dogs by using an automatic analysis system could be advantageous, however, no system is currently validated in dogs at the time of writing. Unfortunately, insufficient clinical and laboratory parameters were available to calculate the APPLE full or further objective risk stratification models. In this study, detection of NRBCs in the peripheral blood of critically ill dogs was associated with increased mortality. Results suggest that anaemic dogs have a higher prevalence of NRBCs compared to those with non-anaemic dogs and dogs with regenerative anaemia have a higher prevalence of NRBCs compared with non-regenerative anaemia. The presence of NRBCs in

peripheral blood may have merit as an additional prognostic tool in critically ill dogs in the future. However, the effect may be due to the contribution of anaemic dogs so results should be interpreted with caution in non-anaemic critically ill dogs.

7. References

- AROCH, I., SEGEV, G., LOEB, E. & BRUCHIM, Y. (2009) Peripheral nucleated red blood cells as a prognostic indicator in heatstroke in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 544–551
- BONING, A., STACHON, A., WEISSER, H., KRISMANN, M., SKIPKA, G., LACZKOVICS, A. M. & KRIEG, M. (2001) Postoperative cholesterol and erythroblasts as a parameter of perioperative mortality after cardiothoracic surgery. *Zeitschrift fuer Herz Thorax und Gefaesschirurgie* 15, 242–248
- BOSKABADI, H., MAAMOURI, G., SADEGHIAN, M. H., GHAYOUR-MOBARHAN, M., HEIDARZADE, M., SHAKERI, M.-T. & FERNS, G. (2010) Early diagnosis of perinatal asphyxia by nucleated red blood cell count: a case-control study. *Archives of Iranian Medicine* 13, 275–281
- CONSTANTINO, B. T. & COGIONIS, B. (2000) Nucleated RBCs--Significance in the Peripheral Blood Film. *Laboratory Medicine* 31, 223–229
- COWELL, R. L., TYLER, R. D. & MEINKOTH, J. H. (1999) *Diagnostic Cytology and Hematology*. 2nd edn. St. Louis
- GOERTZ, O., GHARAGOZLOU, A. F., HIRSCH, T., HOMANN, H. H., STEINAU, H. U., DAIGELER, A., KEMPF, R. & STACHON, A. (2011) Long-Term Comparison of a Routine Laboratory Parameter-Based Severity Score With APACHE II and SAPS II. *The Journal of Trauma* 71, 1835–1840
- GUNNING, K. & ROWAN, K. (1999) ABC of intensive care: outcome data and scoring systems. *British Medical Journal* 319, 241–244
- HAUPTMAN, J. G., WALSHAW, R. & OLIVIER, N. B. (1997) Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Veterinary Surgery* 26, 393–397
- HAYES, G., MATHEWS, K., DOIG, G., KRUTH, S., BOSTON, S., NYKAMP, S., POLJAK, Z. & DEWEY, C. (2010) The acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) score: a severity of illness stratification system for hospitalized dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24, 1034–1047

KIL, T. H., HAN, J. Y., KIM, J. B., KO, G. O., LEE, Y. H., KIM, K. Y. & LIM, J. W. (2011) A study on the measurement of the nucleated red blood cell (nRBC) count based on birth weight and its correlation with perinatal prognosis in infants with very low birth weights. *Korean Journal of Pediatrics* 54, 69–78

KING, L. G., WOHL, J. S., MANNING, A. M., HACKNER, S. G., RAFFE, M. R. & MAISLIN, G. (2001) Evaluation of the survival prediction index as a model of risk stratification for clinical research in dogs admitted to intensive care units at four locations. *American Journal of Veterinary Research* 62, 948–54

LANGHORN, R., OYAMA, M. A., KING, L. G., MACHEN, M. C., TRAFNY, D. J., THAWLEY, V., WILLESEN, J. L., TARNOW, I. & KJELGAARD-HANSEN, M. (2013) Prognostic Importance of Myocardial Injury in Critical Ill Dogs with Systemic Inflammation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27, 895–903

LE GALL, J. R., LOIRAT, P., ALPEROVITCH, A., GLASER, P., GRANTHIL, C., MATHIEU, D., MERCIER, P., THOMAS, R. & VILLERS, D. (1984) A simplified acute physiology score for ICU patients. *Critical Care Medicine* 12, 975–977

LEHNHARDT, M., KATZY, Y., LANGER, S., DRUECKE, D., HOMANN, H. H., STEINSTRAESSER, L., STEINAU, H. U., PH, D. & STACHON, A. (2005) Prognostic Significance of Erythroblasts in Burns. *Plastic and Reconstructive Surgery* 115, 120–127

LESESVE, J. F., BORDIGONI, P., MAURER, P. & LECOMPTE, T. (2006) Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients with multiple organ failure. *Clinical and Laboratory Haematology* 28, 145

MEYER, D. J. & HARVEY, J. W. (1997) *Veterinary Laboratory Medicine*. 2nd edn. Pennsylvania, 57

MISCHKE, R. (2006) Interpretation von Veränderungen im Blutaussstrich-2. Erythrozyten und Thrombozyten. *Fachpraxis Labordiagnostik* 49, 20–21

NGUYEN, D. T. & DIAMOND, L. W. (2000) *Diagnostic Hematology: A Pattern Approach*. Oxford

SCHWARZT, S. O. & STANSBURY, F. (1954) Significance of nucleated red blood cells in peripheral blood; analysis of 1,496 cases. *Journal of the American Medical Association* 154, 1339–1340

STACHON, A., BECKER, A., KEMPF, R., HOLLAND-LETZ, T., FRIESE, J. & KRIEG, M. (2008) Re-evaluation of established risk scores by measurement of nucleated red blood cells in blood of surgical intensive care patients. *The Journal of Trauma* 65, 666–673

STACHON, A., BONING, A., KRISMANN, M., WEISSER, H., LACZKOVICS, A., SKIPKA, G. & KRIEG, M. (2001) Prognostic significance of the presence of erythroblasts in blood after cardiothoracic surgery. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 39, 239–243

STACHON, A., EISENBLATTER, K., KOLLER, M., HOLLAND-LETZ, T. & KRIEG, M. (2003) Cytokines and erythropoietin in the blood of patients with erythroblastemia. *Acta Haematologica* 110, 204–206

STACHON, A., HOLLAND-LETZ, T., KEMPF, R., BECKER, A., FRIESE, J. & KRIEG, M. (2006) Poor prognosis indicated by nucleated red blood cells in peripheral blood is not associated with organ failure of the liver or kidney. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 44, 955–961

STACHON, A., HOLLAND-LETZ, T. & KRIEG, M. (2004) High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC* 42, 933–938

STACHON, A., KEMPF, R., HOLLAND-LETZ, T., FRIESE, J., BECKER, A. & KRIEG, M. (2006) Daily monitoring of nucleated red blood cells in the blood of surgical intensive care patients. *Clinica Chimica Acta* 366, 329–335

STACHON, A., SEGBERS, E., HOLLAND-LETZ, T., KEMPF, R., HERING, S. & KRIEG, M. (2007) Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Critical Care* 11, R62

STACHON, A., SONDERMANN, N., IMOHL, M. & KRIEG, M. (2002) Nucleated red blood cells indicate high risk of in-hospital mortality. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 140, 407–412

TAVASSOLI, M. (1975) Erythroblastemia. *The Western Journal of Medicine* 122, 194–198

WILLARD, MD & TVEDTEN, H (1994) *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* 2nd, Philadelphia, PA, WB Saunders, 17

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden prospektiven Studie wurde das Auftreten von Rubrizyten im peripheren Blut von schwer systemisch erkrankten Hunden untersucht. In der Humanmedizin existieren bereits viele Studien, die kernhaltige Erythrozyten auf ihre prognostische Aussagekraft untersucht haben. In der Veterinärmedizin hingegen existiert bisher erst eine Studie, in der untersucht wurde, ob kernhaltige Erythrozyten als prognostischer Parameter bei Hunden mit Hitzschlag eingesetzt werden können (AROCH et al., 2009). Ziel der Studie war es herauszufinden, ob Rubrizyten im peripheren Blut von kritisch kranken Hunden auftreten und inwiefern das Auftreten von Rubrizyten mit dem Verlauf und dem Ausgang der Erkrankung assoziiert werden kann.

In der vorliegenden Studie wurden bei 41,5 % der Hunde Rubrizyten im peripheren Blut gefunden. Bei Hunden mit Hitzschlag lag die Prävalenz von Rubrizyten bei 90 %, bei Einlieferung (AROCH et al., 2009). Bei Hunden mit Hitzschlag wird der direkte Einfluss von Hitze auf das Knochenmark als Ursache für die hohe Prävalenz bei Hunden mit Hitzschlag gesehen (AROCH et al., 2009). Um einen Überblick über die Prävalenz von Patienten aus der Humanmedizin mit Normoblasten im peripheren Blut zu erhalten, untersuchten Stachon et al. (2002) 4173 hospitalisierte Patienten und fanden eine erhöhte Prävalenz bei Patienten auf der Intensivstation. Aus diesem Grund untersuchte die Arbeitsgruppe um Stachon in Folgestudien vorwiegend das periphere Blut von Patienten auf der Intensivstationen verschiedener Abteilungen (Innere Medizin, Chirurgie, nach kardio-thorakalen Eingriffen). Die Prävalenz in diesen Studien reichte von 7.5 % bis 32 %. Die Studienpopulation bestand aus Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen. Interessanterweise konnte sowohl in der vorliegenden Studie, als auch in der Studie von Aroch et al. (2009), eine höhere Prävalenz bei Hunden im Vergleich zu Patienten in der Humanmedizin festgestellt werden.

Alle bisher vorliegenden Studien in der Humanmedizin, in denen die prognostische Aussagekraft von Normoblasten im peripheren Blut untersucht wurde, zeigten bei Patienten mit Normoblasten im peripheren Blut eine erhöhte Mortalität und folglich wird das Auftreten von kernhaltigen roten Blutzellen im peripheren Blut als negativ prognostischer Faktor gesehen (STACHON et al., 2001; STACHON et al., 2002; STACHON et al., 2003; STACHON et al., 2004; STACHON et al., 2005; STACHON et al., 2006a; STACHON et al., 2006b; STACHON et al., 2007; STACHON et al., 2008). Lenhart et al. (2005) konnten eine signifikant höhere Mortalität bei Brandopfern bestätigen, wenn diese Normoblasten im peripheren Blut hatten. Untersuchungen bei Frühchen mit sehr niedrigen Geburtsgewicht konnten zeigen, dass ein Anstieg bzw. ein fehlender Rückgang von Normoblasten im peripheren Blut mit perinatalen Komplikationen, wie einer fetale Hypoxie, einhergeht (KIL et al., 2011). In der Veterinärmedizin konnte die Studie von Aroch et al. bei Hunden mit Hitzeschlag, ebenso wie die vorliegende Studie, zeigen, dass das Auftreten von Rubrizysten mit einer erhöhten Mortalität einhergeht.

Wie zuvor in der Humanmedizin wurden Hunde mit verschiedenen Erkrankungen, die sich klinisch in einem kritischen Zustand befanden, unabhängig von ihrer Grunderkrankung in die Studienpopulation aufgenommen. Alle Hunde erfüllten, unabhängig von ihrer Grunderkrankung, mindestens zwei SIRS Kriterien. Die meisten Hunde (n=49) erfüllten drei von vier SIRS Kriterien und fünfzehn Hunde erfüllten sogar vier von vier SIRS Kriterien. Die Hunde wurden anhand ihres Vorstellungsgrundes in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt. In die Gruppe der Hunde mit infektiösen Erkrankungen wurden Hunde mit Parvovirose, Leptospirose, Sepsis, Bronchopneumonie, Ehrlichiose, Anaplasmosen, Pyometra sowie mit Hinweis auf eine Lungenwurmerkrankung inkludiert. In die Gruppe der neoplastischen Erkrankungen fielen Hunde bei denen ein Mammatumore, Lymphom, Mastzelltumor oder Hämangiosarkom diagnostiziert wurde sowie Hunde mit Verdacht auf Leukämie. Eine weitere Gruppe stellt die Gruppe der immunmedierten Erkrankungen dar, hierzu zählten Hunde mit immunmediertem hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie, Evans Syndrom, immunmedierte Polyarthritiden und Sterile eitrige Meningitis Arteriitis. Zu der Gruppe der metabolischen Erkrankungen zählten Hunde in der Diabetischen Ketoazidose mit Hyperadrenokortizismus und daraus resultierender Pulmonaler Thromboembolie

sowie Hund mit Proteinverlust Enteropathie. Die meisten Hunde wurden in die Gruppe der „sonstigen Erkrankungen“ eingeteilt. In dieser Gruppe wurden Hunde mit Intoxikationen, Torsi ventrikuli, Hitzschlag, Hunde nach Fremdkörperaufnahme, mit Pankreatitis, Pneumothorax, Pleuralspalterguss, im akuten Nierenversagen, im kongestiven Herzversagen sowie im hypovolämischen Schock inkludiert. Da die Ätiologie der verschiedenen Erkrankungen bei diesen Hunden nicht geklärt werden konnte, fielen diese Hunde in die Gruppe der verschiedenen Erkrankungen. Unter den Hunden, die Rubrizyten positiv waren, konnte keine Prävalenz für eine bestimmte Erkrankung festgestellt werden, jedoch zeigte die vorliegende Studie, dass 42 % der gesamten Patienten anämisch ($Hkt < 0.31/l$) waren. Vorangegangene Studien zeigten ein erhöhtes Auftreten von Rubrizyten bei anämischen Hunden, mit Erkrankungen der Milz (bei denen es sich in dieser Studie ausschließlich um anämische Hunde handelte und somit zu der Gruppe der anämischen Hunde gezählt wurde) sowie bei Knochenmarkserkrankungen. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie eine separate Gruppe an Hunden untersucht, mit dem Ziel eine unbefangene Gruppe an kritisch kranken Hunden zu untersuchen. Aufgrund des invasiven Charakters einer Knochenmarksaspiration, zum Ausschluss einer Infiltration des Knochenmarks, wurde in der vorliegenden Studie auf eine zytologische Untersuchung des Knochenmarks verzichtet. Aus diesem Grund kann eine Knochenmarksbeteiligung nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die verbleibende Studienpopulation zeigte, nach Exklusion der anämischen Hunde, nach wie vor eine erhöhte Mortalität für Hunde, die Rubrizyten positiv waren, welche jedoch nicht mehr signifikant war. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die verbleibende geringe Anzahl an Hunde sein. Nichtsdestotrotz muss an dieser Stelle jedoch kritisch diskutiert werden, wie viele von den kritisch kranken Hunden Rubrizyten im peripheren Blut hatten aufgrund ihres kritisch kranken Zustandes oder aufgrund der Tatsache dass sie anämisch waren. Rubrizyten konnten außerdem bei mehr Hunden mit regenerativer Anämie im Gegensatz zu Hunden mit aregenerativer Anämie festgestellt werden. Überstürzte Regeneration sowie extramedulläre Hämatopoese werden sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin als mögliche Ursache für das Auftreten von kernhaltigen Erythrozyten im peripheren Blut beschrieben (CONSTANTINO & COGIONIS, 2000; MISCHKE, 2006; ZENKER & HIRSCHBERGER, 2006). In der Veterinärmedizin wird das Auftreten von Rubrizyten im peripheren Blut von

Mischke et al. (2006) insbesondere im Zusammenhang mit immunvermittelter (hämolytischer) Anämie beschrieben. Durch den erhöhten Bedarf an Erythrozyten kommt es zu einer gesteigerten Produktion von erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark und folglich kann es zu einer Überlastung des Sinusendothels kommen. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass bei allen Hunden mit regenerativer Anämie, mit Ausnahme von einem Hund, Rubrizyten im peripheren Blut gefunden werden konnten.

Obwohl es sich hierbei um eine sehr heterogene Gruppe von kritisch kranken Hunden handelt kann bei vielen dieser Erkrankungen ein gewisser Grad von Gewebehypoxie nicht ausgeschlossen werden. In den meisten Fällen hervorgerufen durch hypovolämische Zustände sowie respiratorische Defizite, prothrombotische Bedingungen sowie als Folge einer vorliegenden Anämie. Obwohl bereits einige Hypothesen für das Auftreten von Normoblasten im peripheren Blut existieren, ist der exakte Mechanismus weder in der Humanmedizin, noch in der Veterinärmedizin vollständig geklärt (CONSTANTINO & COGIONIS, 2000). Untersuchungen in der Humanmedizin unterstützen die Hypothese, dass Normoblasten als zuverlässiger Indikator für Hypoxie und inflammatorische Prozesse bei kritisch kranken Patienten gesehen werden können (STACHON et al., 2003). Diese Fragestellung könnte in Folgestudien, die das periphere Blut von kritisch kranken Hunden sowohl auf Rubrizyten als auch auf das, hauptsächlich in der der Leber gebildete akute Phaseprotein C-reaktives Protein (CRP) untersuchen, geklärt werden. Des Weiteren könnte eine Bestimmung des arteriellen Sauerstoff-Partialdruck bei diesen Patienten die Hypothese der Hypoxie unterstützen.

Studien in der Humanmedizin zeigten außerdem, dass die Mortalität mit der Menge und der Frequenz des Auftretens der Normoblasten steigt (STACHON et al., 2006b). Eine Konzentration $>2000/\mu\text{l}$ wird in der Humanmedizin mit einer 100 % Mortalitätswahrscheinlichkeit gleichgesetzt (STACHON et al., 2006b). Bei Verbrennungsoptionen standen $>1000/\mu\text{l}$ Normoblasten im peripheren Blut als ein Indikator für eine 100 % Mortalität (LEHNHARDT et al., 2005). Im Unterschied zu der vorliegenden Studie wurden die kernhaltigen Erythrozyten in diesen Studien automatisch gezählt. Die automatische Bestimmung der kernhaltigen Erythrozyten (Symex XE-2100) lässt eine präzise Quantifizierung zu. Demnach ist sie in der Lage auch eine niedrige Anzahl an Normoblasten zu detektieren. Die

vorliegende Studie zeigte im Vergleich zu der Studie von (ARoch et al., 2009) einen niedrigen medianen Gehalt an kernhaltigen Erythrozyten, weshalb die Hunde in der vorliegenden Studie nur in positive (Rubrizyten im peripheren Blut an mindestens einem der Untersuchungstage) oder negative eingeteilt wurden.

Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie, in welcher der exakte Zeitpunkt des Krankheitsbeginnes oft unbekannt war, da die Erstvorstellung des Patienten oft nicht mit dem Beginn der Erkrankung übereinstimmte, wurden in Studien der Humanmedizin und bei Hunden mit Hitzschlag ein verzögertes Auftreten von kernhaltigen Erythrozyten berichtet (STACHON et al., 2001; STACHON et al., 2002; STACHON et al., 2004). Aroch et al. (2009) belegten ein vermehrtes Auftreten von kernhaltigen Erythrozyten 12 bis 24 Stunden nach Ankunft in der Klinik bei Hunden mit Hitzschlag. In dieser Studie konnte bei zehn, der initial negative getesteten Hunde, Rubrizyten an Tag eins detektiert werden. Bei sechs initial positiv getesteten Hunden konnten hingegen keine Rubrizyten an Folgetagen gefunden werden. Studien aus der Humanmedizin berichten ebenfalls von einem verzögerten Auftreten von Normoblasten nach dem jeweiligen Insult (STACHON et al., 2001). Bei Verbrennungsoptionen können Normoblasten im Durchschnitt nach 10 (\pm 4) Tagen nach Insult und 13 (\pm 6) Tage vor dem Tod das erste Mal gefunden werden (LEHNHARDT et al., 2005). Stachon et al. (2001) fanden Normoblasten 11 (\pm 2) Tage nach kardiothorakalen Eingriffen das erste Mal im peripheren Blut. Böning et al. (2001) berichteten, dass 60 % der Patienten erst ab dem siebten Tag nach Herzoperationen kernhaltige Erythrozyten im peripheren Blut hatten. Nach kardiothorakalen Eingriffen wurden Normoblasten im Durchschnitt 8 (\pm 2) Tage, bei hospitalisierten Patienten im Durchschnitt 21 Tage und bei Patienten der Intensivstation 13 Tage vor dem Ableben der Patienten detektiert (STACHON et al., 2001; STACHON et al., 2002; STACHON et al., 2004). In der vorliegenden Studie wurde das periphere Blut von Patienten nicht weiter auf kernhaltige Erythrozyten getestet, wenn der Patient aus der Intensivstation entlassen wurde und SIRS Kriterien nicht mehr erfüllt waren. Dies könnte dazu geführt haben, dass Patienten, die im Laufe ihres klinischen Aufenthaltes noch Rubrizyten im peripheren Blut gehabt hätten, nicht mehr erfasst werden konnten. Des Weiteren werden kernhaltige Erythrozyten im Blut als ein transientes Phänomen beschrieben. Aus diesem Grund raten Autoren zu einer kontinuierlichen Messung während des stationären Aufenthaltes

(STACHON et al., 2002).

Die vorliegende Studie fand eine Korrelation zwischen Retikulozyten und dem Auftreten von Rubrizyten. Hunde mit Retikulozyten $>60.000 \times 10^3/l$ sowie mit einem Hkt $<0,3l/l$ hatten mehr gesamt Rubrizyten und mehr Rubrizyten an Tag 1 im peripheren Blut. Stachon et al. (2006) fanden eine Korrelation zwischen dem Anstieg des Normoblastengehaltes und einem erniedrigten Hämoglobingehalt. Kuert et al. (2011) zeigten eine Korrelation von einem erniedrigten arteriellen Sauerstoffpartialdruck und dem Auftreten von kernhaltigen Erythrozyten und unterstützen damit die zuvor von uns erhobene Hypothese, dass ein hypoxisches Ereignis im Zusammenhang mit dem Auftreten kernhaltiger Erythrozyten im peripheren Blut stehen kann. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie konnte eine humanmedizinische Studie eine signifikante Korrelation zwischen Leukozyten und Normoblasten belegen und somit die Annahme, dass kernhaltige Erythrozyten im Rahmen eines entzündlichen Prozesses vermehrt zu sehen sind unterstützen (STACHON et al., 2002). Ein Jahr darauf zeigt eine Studie von Stachon et al. (2005), dass EPO, IL-6, IL-12p70 sowie Stammzellfaktoren bei Patienten mit kernhaltigen Erythrozyten im peripheren Blut signifikant erhöht sind (STACHON et al., 2005). Während die Normoblasten positiven Patienten in der Studie von Stachon et al. (2005) höhere Nieren- und Leberwerte hatten als Normoblasten negative Patienten, konnte die Studie von Stachon et al. (2006) keine Assoziation zwischen dem Auftreten von kernhaltigen Erythrozyten und einer Beeinträchtigung von Leber und Niere feststellen. Bei Patienten der internistischen Intensivstation in der Humanmedizin konnte bei einem Anstieg von kernhaltigen Erythrozyten gleichzeitig ein Anstieg der Leukozyten sowie des Kreatinins detektiert werden (STACHON et al., 2007). Aroch et al. (2009) konnten bei Hunden mit Hitzeschlag eine Korrelation der Rubrizyten und der Prothrombin und partiellen Thromboplastinzeit sowie den Leukozyten, Lymphozyten und dem Glukosegehalt feststellen (AROCH et al., 2009). Die vorliegende Studie ist die erste Studie, die eine Korrelation von Rubrizyten mit Hkt und Retikulozyten beschreibt und damit die Hypothese bekräftigt, dass Rubrizyten bei vermehrter Regeneration im peripheren Blut gefunden werden können.

Im Laufe der letzten Jahre wurden sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin Scoringssysteme entwickelt um eine Kategorisierung der

Patienten zu vereinfachen. Humanmedizinische Studien zeigten dass ein Anstieg der kernhaltigen Erythrozyten mit einem Punkteanstieg der Scoringsysteme korrelierte (STACHON et al., 2008). Die retrospektive Evaluierung des APPLE fast, ein für Hunde evaluiertes Scoringssystem, korrelierte nicht mit dem Auftreten von Rubirzyten im peripheren Blut. Hunde, die nicht überlebten, wiesen einen höheren APPLE score auf als Hunde, die überlebten. Als mögliche Ursachen für die fehlende Korrelation kommt die retrospektive und einmalige Evaluation des APPLE fast in Frage. Ein möglicher Anstieg an Folgetagen mit einem Fortschreiten der Erkrankung ist möglich. Jedoch kann an dieser Stelle, die bisher noch nie evaluierte Brauchbarkeit von Rubrizyten als prognostischer Faktor, in Frage gestellt werden. Etablierte Scoringsysteme wie APPLE fast oder APPLE full könnten jedoch, wie bereits in der Humanmedizin beschrieben, von kernhaltigen Erythrozyten als zusätzliche unabhängige Variable profitieren (STACHON et al., 2007; STACHON et al., 2008). Folglich kann diskutiert werden, ob es sinnvoll ist, auch in der Veterinärmedizin bereits existierenden Scoringsystemen wie APPLE und SPI um einen Parameter wie kernhaltige Erythrozyten zu erweitern. Dieser Fragenstellung sollte in zukünftigen Studien nachgegangen werden.

Diese Studie enthält einige Limitationen. SIRS Kriterien als Einschlusskriterien heranzuziehen, birgt die Gefahr, da es sich um unspezifische klinische Parameter handelt, auch nicht kritisch kranke Hunde in die Studie aufgenommen wurden. Aufgrund der hohen Sensitivität (97%) für das Vorliegen von SIRS, wurde in der vorliegenden Studie die Kriterien von Hauptmann et al. als Einschlusskriterien herangezogen. Abhängig von dem mentalen Zustande der Hunde, können Atemfrequenz, Herzfrequenz und innere Körpertemperatur leicht beeinflusst werden. Da Kriterien von Hauptmann et al. aus der Humanmedizin abgeleitet wurden wird die für den Hund in Norm liegende Atemfrequenz von 20 Atemzüge pro Minute als Einschlusskriterium kritische betrachtet (OKANO et al., 2002). Ein Parameter zur Beurteilung des Schweregrades einer systemischen Entzündungsreaktion stellt das C-reaktive Protein dar (GEBHARDT et al., 2009). C-reaktives Protein als Einschlusskriterium für kritisch kranke Hunde heranzuziehen, wurde in einer kürzlich durchgeführten Studie (LANGHORN et al., 2013) gemacht und wäre eine Alternative gewesen. Gebhardt et al. konnte (2009) keine Korrelation zwischen Mortalität und der intialen C-reativen Protein

Konzentration bei kritisch kranken Hunden zeigen. In zukünftigen Studien sollte die Korrelation zwischen C-reaktivem Protein und kernhaltigen Erythrozyten bei kritisch kranken Hunden überprüft werden.

Bei der Methode der manuellen Auszählung von kernhaltigen Erythrozyten im Blutausschrieb handelt es sich um eine im Vergleich zur automatischen Messung ungenauen Methode (STACHON et al., 2001). Bei einer mikroskopisch manuellen Auszählung ist eine Detektion von weniger als 200 Normoblasten pro μl schwierig (STACHON et al., 2001). Eine manuelle Auszählung stellt jedoch eine preisgünstige, leicht durchführbare Methode für die Praxis dar. In der Veterinärmedizin existierte die Möglichkeit der automatischen Messung zum Zeitpunkt der Studie nicht und daher wurden kernhaltige Erythrozyten, wie in der vorangegangenen veterinärmedizinischen Studie, manuell bestimmt. Eine Routineuntersuchung auf Rubrizyten, während des gesamten stationären Aufenthaltes, wäre sinnvoll um ein transientes Auftreten von Rubrizyten zu erkennen. Eine automatisch präzise Zählmethode würde eine Routineuntersuchung leichter machen und wäre daher in der Veterinärmedizin von großem Vorteil.

Eine weitere Limitation stellt die Tatsache dar, dass von den „nicht Überlebenden“ Studienpatienten, 33 Hunde euthanasiert wurden und somit in die Gruppe der „nicht Überlebenden“ fallen. Die Entscheidung zur Euthanasie wird in der Veterinärmedizin oft durch den Besitzer, den Tierarzt und vor allem durch die Prognose des Patienten beeinflusst. Diese Limitation konnte aus ethischen Gründen nicht umgangen werden. Des Weiteren wäre eine größere Studienpopulation ohne prädisponierte Hunde (z.B. anämische Hunde) wünschenswert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es jedoch eine heterogene Studienpopulation zu untersuchen, um zu sehen, ob eine Prädisposition für eine Erkrankung, eine Erkrankungsgruppe oder ein Symptom wie Anämie bestätigt werden kann.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass Rubrizyten im peripheren Blut bei kritisch kranken Hunden mit einer erhöhten Mortalität einhergehen. Eine erhöhte Prävalenz für das Auftreten von Rubrizyten konnte bei Hunden mit regenerativer Anämie festgestellt werden. Der Pathomechanismus für das Auftreten von Rubrizyten im peripheren Blut ist nicht vollständig geklärt, jedoch geben die

Ergebnisse der vorliegenden Studie Hinweise auf einen potenziellen prognostischen Laborparameter, mit dem Ziel, Risikopatienten frühzeitig zu erkennen, adäquat zu überwachen und zu behandeln.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Kernhaltige rote Blutzellen, auch Rubrizyten oder Normoblasten genannt, werden im peripheren Blut von kritisch kranken Menschen als negativer prognostischer Faktor gesehen und gehen, gemäß Studien der Humanmedizin, mit einer erhöhten Mortalität einher.

In der Veterinärmedizin existiert erst eine Studie, die das periphere Blut von Hunden mit Hitzschlag auf Rubrizyten untersucht hat. Diese Studie zeigte, dass Rubrizyten als sensitiver und spezifischer Marker für sekundäre Komplikationen gesehen werden können und mit einer schlechten Prognose einhergehen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, sowohl die Prävalenz für Rubrizyten bei kritisch kranken Hunden zu untersuchen, als auch deren prognostische Aussagekraft zu evaluieren.

Kritisch kranke Hunde mit unterschiedlichen Erkrankungen, die mindestens zwei SIRS Kriterien erfüllten, wurden in die Studie aufgenommen. Blutproben wurden alle 24 Stunden bis Tag 3, bzw. bis zur Entlassung aus der Intensivstation auf Rubrizyten untersucht. Die Zählung erfolgte anhand eines Blutausstriches manuell, nach einer in der Literatur beschriebenen Methode.

Um die prognostische Aussagekraft von Rubrizyten zu beurteilen wurde anhand klinischer und labordiagnostischer Parameter für jeden Patienten der APPLE fast Score berechnet. Hierbei handelt es sich um ein für den Hund validiertes Scoringssystem mit dessen Hilfe anhand von objektiven Parametern der Schweregrad der Beeinträchtigung und die damit verbundene Prognose evaluiert werden kann. Das Überleben wurde als Überleben für mindestens 28 Tage nach Entlassung aus der Tierklinik definiert.

Von den 101 Hunden, welche die Einschlusskriterien erfüllten, konnte bei 42 Hunden mindestens einmal Rubrizyten im peripheren Blut detektiert werden und somit eine Prävalenz von 41,5 % festgestellt werden. Im Vergleich zu Hunden mit Hitzschlag stellt dies eine geringere Prävalenz dar, jedoch eine höhere im Vergleich zu der bisher beschriebenen Prävalenz von kernhaltigen Erythrozyten bei kritisch kranken Patienten in der Humanmedizin.

Die Mortalität der Hunde mit Rubrizyten im peripheren Blut lag in dieser Studie signifikant über der Mortaliätsrate der Hunde ohne Rubrizyten (54.8 % vs. 30.5 %) ($p = 0.014$).

Hunde mit unterschiedlichen Erkrankungen (neoplastisch, metabolische, immunmediert, infektiös oder sonstige Erkrankungen) wurden inkludiert, jedoch konnte kein gehäuftes Auftreten von Rubrizyten für eine bestimmte Erkrankungsgruppe gefunden werden. Ein vermehrtes Auftreten von Rubrizyten konnte bei Hunden mit einer regenerativen Anämie gesehen werden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen somit die zuvor in der Literatur beschriebene Korrelation von Rubrizyten mit regenerativen Prozessen und gesteigerter Hämatopoese. Nach Exklusion der für das Auftreten von Rubrizyten prädisponierten Hunde (Anämie, Erkrankungen mit Beteiligung der Milz) konnte nach wie vor eine erhöhte Mortalität beobachtet werden, welche jedoch nicht mehr signifikant war. Rubrizyten können demnach als ein Indikator für Regeneration gesehen werden und können eventuell in der Zukunft als prognostischer Parameter bei kritisch kranken Hunden genutzt werden. Die retrospektive Bestimmung des Scoringsystems (APPLE fast) konnte keine Korrelation mit dem Auftreten von Rubrizyten zeigen.

Zusammengefasst hat die Studie gezeigt, dass Rubrizyten bei kritisch kranken Hunden und vermehrt bei Hunden mit regenerativer Anämie im peripheren Blut beobachtet werden können. Um den Einsatz als prognostischen Parameter zu evaluieren sind jedoch weitere Studien notwendig.

VI. SUMMARY

The occurrence of nucleated red blood cells (NRBCs) in the peripheral blood of critically ill human patients is associated with increased mortality. In dogs, the presence of NRBCs in peripheral blood has been used as a sensitive and specific marker of complications and outcome associated with heatstroke. However, no study has investigated their prevalence in critically ill dogs. Thus, the aim of this study was to determine the prevalence of NRBCs in the peripheral blood, and to evaluate their occurrence as a prognostic factor in critically ill dogs.

One-hundred-one dogs were prospectively included. Dogs fulfilled at least two systemic inflammatory response syndrome (SIRS) criteria and suffered from various diseases. Survival was defined as being alive 28 days post discharge from hospital. Blood samples were obtained for determination of the APPLE fast and the presence of NRBCs was determined manually on a daily basis from the time of admission until day 3 in the intensive care unit (or less if discharged or death occurred earlier).

In 42 dogs, NRBCs were detected at least once; 59 patients were NRBC negative, demonstrating a prevalence of 41.5 % for the appearance of NRBCs in this population. The previous study in veterinary medicine reported a higher prevalence in dogs with heatstroke, however all human medicine studies described a lower prevalence of NRBCs in critically ill patients. Mortality was significantly higher in NRBC-positive than NRBC-negative patients (54.8 % vs. 30.5 %) ($p = 0.014$). However, this association was not present when anaemic dogs were excluded from the analysis. The APPLE fast score of the NRBC-positive dogs did not differ from that of the NRBC-negative dogs.

Results suggest that anaemic dogs have a higher prevalence of NRBCs compared to those with non-anaemic dogs and dogs with regenerative anaemia have a higher prevalence of NRBCs compared with non-regenerative anaemia. The presence of NRBCs in peripheral blood may have merit as an additional prognostic tool in critically ill dogs in the future. However, the effect may be due to the contribution of anaemic dogs so results should be interpreted with caution in non-anaemic critically ill dogs.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

ACCP-SCCM. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992; 20: 864-74.

Aroch I, Segev G, Loeb E, Bruchim Y. Peripheral nucleated red blood cells as a prognostic indicator in heatstroke in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine 2009; 23: 544-51.

Böning A, Stachon A, Weisser H, Krismann M, Skipka G, Laczkovics AM, Krieg M. Postoperative cholesterol and erythroblasts as a parameter of perioperative mortality after cardiothoracic surgery. Zeitschrift für Herz Thorax und Gefasschirurgie 2001; 15: 242-8.

Boskabadi H, Maamouri G, Sadeghian MH, Ghayour-Mobarhan M, Heidarzade M, Shakeri M-T, Ferns G. Early diagnosis of perinatal asphyxia by nucleated red blood cell count: a case-control study. Archives of Iranian Medicine 2010; 13: 275-81.

Constantino BT, Cogionis B. Nucleated RBCs-Significance in the Peripheral Blood Film. Laboratory Medicine 2000; 31: 223-9.

De Laforcade AM. Systemic Inflammatory Response Syndrom. In: Small animal Critical Care Medicine. Silverstein DC, Hopper K, eds. St. Louis: SAUNDERS 2009: 46-9.

Engelhardt W, Breves G. Physiologie der Haustiere, 3th edn Stuttgart: 2010: 203-10.

Gebhardt C, Hirschberger J, Rau S, Arndt G, Krainer K, Schweigert FJ, Brunnberg L, Kaspers B, Kohn B. Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2009; 19: 450-8.

Groen J, Godfried EG. The occurrence of normoblasts in the peripheral blood in congestive heart failure; an indication of unfavorable prognosis. Blood 1948; 3:

1445-52.

Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB. Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Diagnostic Criteria for Sepsis in Dogs. *Veterinary Surgery* 1997; 26: 393.

Hayes G, Mathews K, Doig G, Kruth S, Boston S, Nykamp S, Poljak Z, Dewey C. The acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) score: a severity of illness stratification system for hospitalized dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010; 24: 1034-47.

Hayes G, Mathews K, Doig G, Kruth S, Boston S, Nykamp S, Poljak Z, Dewey C. The Feline Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation (Feline APPLE) Score: a severity of illness stratification system for hospitalized cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; 25: 26-38.

Junger A, Engel J, Benson M, Hartmann B, Röhrig R, Hempelmann G. Risk predictors, scoring systems and prognostic models in anesthesia and intensive care. Part II. Intensive Care. *Anesthesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie AINS* 2002; 37: 591-9.

Kil TH, Han JY, Kim JB, Ko GO, Lee YH, Kim KY, Lim JW. A study on the measurement of the nucleated red blood cell (nRBC) count based on birth weight and its correlation with perinatal prognosis in infants with very low birth weights. Korean Journal of Pediatrics 2011; 54: 69-78.

King L. Survival Prediction Index. In: Small Animal CRITICAL CARE MEDICINE. Siverstein DC, Hopper K, eds. St. Louis, Missouri: Saunders 2009: 9-12.

King LG, Stevens MT, Ostro E, Phil D, Shankar R. A Model For Prediction Of Survival In Critically Ill Dogs. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 1994; 4: 85-99.

King LG, Fordyce H, Campellone M, Maislin G. Serial Estimation of Survival Prediction Indices Does Not Improve Outcome Prediction in Critically Ill Dogs with Naturally Occurring Disease. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2001a; 11: 183-9.

King LG, Wohl JS, Manning M, Hackner SG, Raffe MR, Maislin G. Evaluation of the survival prediction index as a model of risk stratification for clinical research in dogs admitted to intensive care units at four locations. American Journal of Veterinary Research 2001b; 62: 948-54.

Kitamura N, Hikita S, Yokohari K, Hirasawa H. Diagnosis of deteriorating systemic inflammatory response syndrom (SIRS). Japanese Journal of Acute Medicine 1996; 20: 1051-5.

Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. Critical Care Medicine 1981; 9: 591-7.

Knaus WA. APACHE 1978-2001: the development of a quality assurance system based on prognosis: milestones and personal reflections. Archives of Surgery 2002; 137: 37-41.

Kuert S, Holland-Letz T, Friese J, Stachon A. Association of nucleated red blood cells in blood and arterial oxygen partial tension. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2011; 49: 257-63.

Langhorn R, Oyama MA, King LG, Machen MC, Trafny DJ, Thawley V,

Willesen JL, Tarnow I, Kjelgaard-Hansen M. Prognostic Importance of Myocardial Injury in Critically Ill Dogs with Systemic Inflammation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; 27: 895-903.

Le Gall JR, Loirat P, Alperovitch A, Glaser P, Granthil C, Mathieu D, Mercier P, Thomas R, Villers D. A simplified acute physiology score for ICU patients. *Critical Care Medicine* 1984; 12: 975-7.

Lehnhardt M, Katzy Y, Langer S, Druecke D, Homann HH, Steinstraesser L, Steinau HU, Stachon A. Prognostic Significance of Erythroblasts in Burns. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2005; 115: 120-7.

Lemeshow S, Le Gall JR. Modeling the severity of illness of ICU patients. A systems update. *Journal of the American Medical Association* 1994; 272: 1049-55.

Lesesve JF, Bordigoni P, Maurer P, Lecompte T. Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients with multiple organ failure. *Clinical and Laboratory Haematology* 2006; 28: 145.

- Littner Y, Mandel D, Sheffer-Mimouni G, Mimouni FB, Deutsch V, Dollberg S. Nucleated red blood cells in infants of smoking mothers. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2003; 93: 403-6.
- Löffler H, Rastetter J, Haferlach T. Atlas der klinischen Hämatologie, 6 edn. Heilmeyer L, Begemann H, eds. Berlin: 2004: 28.
- Meyer DJ, Harvey JW. Evaluation of Erythrocytic Disorders. In: *Veterinary Laboratory Medicine*, second edn. Meyer DJ, Harvey JW, eds. Pennsylvania: SAUNDERS 1997: 57.
- Mischke R. Physiologie der Blutzellenbildung und Blutstillung. In: *Praktische Hämatologie bei Hund und Katze*. Mischke R, ed. Hannover: Schülersche 2003: 11-4.
- Mischke R. Interpretation von Veränderungen im Blutaussstrich. *Fachpraxis Labordiagnostik* 2006; 49: 20-1.
- Nguyen DT, Diamond LW. Leukoerythroblastic pattern. In: *Diagnostic Hematology: A Pattern Approach* Oxford: Plant a Tree 2000: 165.
- Okano S, Yoshida M, Fukushima U, Higuchi S, Takase K, Hagio M. Usefulness of systemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgement. *Veterinary Record* 2002; 150: 245-6.
- Olver CS. Erythropoiesis. In: *Schalm's Veterinary Hematology*, Sixth Edit edn. Weiss DJ, Wardrop Jk, eds. Iowa: Blackwell 2010: 36-40.
- Otsubo H, Kaito K, Asai O, Usui N, Kobayashi M, Hoshi Y. Persistent nucleated red blood cells in peripheral blood is a poor prognostic factor in patients undergoing stem cell transplantation. *Clinical and Laboratory Haematology* 2005; 27: 242-6.
- Rau S KB, Richter C, Fenske N, Küchenhoff H, Hartmann K, Härtle S, Kaspers B, Hirschberger J. Der Intensivpatient mit Sepsis – Kanines Interleukin-6 als prognostischer Parameter. *Kleintierpraxis* 2009; 54: 201-12.
- Schwarz SO, Stansbury F. Significance of nucleated red blood cells in peripheral blood; analysis of 1,496 cases. *Journal of the American Medical Association* 1954; 154: 1339-40.

Siblernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie, 6. edn. Silbernagl S, Agamemon D, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2003: 88.

Siegenthaler W. Klinische Pathophysiologie. 2001;

Sills R, Hadley R. The significance of nucleated red blood cells in the peripheral blood of children. . American Journal of Pediatric Hematology and Oncology 1983; 5: 173–7.

Stachon A, Boning A, Krismann M, Weisser H, Laczkovics A, Skipka G, Krieg M. Prognostic significance of the presence of erythroblasts in blood after cardiothoracic surgery. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2001; 39: 239-43.

Stachon A, Sondermann N, Imohl M, Krieg M. Nucleated red blood cells indicate high risk of in-hospital mortality. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 2002; 140: 407-12.

Stachon A, Eisenblätter K, Köller M, Holland-Letz T, Krieg M. Cytokines and erythropoietin in the blood of patients with erythroblastemia. *Acta Haematologica* 2003; 110: 204-6.

Stachon A, Holland-Letz T, Krieg M. High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2004; 42: 933-8.

Stachon A, Bolulu O, Holland-Letz T, Krieg M. Association between nucleated red blood cells in blood and the levels of erythropoietin, interleukin 3, interleukin 6, and interleukin 12p70. *Shock* 2005; 24: 34-9.

Stachon A, Holland-Letz T, Kempf R, Becker A, Friese J, Krieg M. Poor prognosis indicated by nucleated red blood cells in peripheral blood is not associated with organ failure of the liver or kidney. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2006a; 44: 955-61.

Stachon A, Kempf R, Holland-Letz T, Friese J, Becker A, Krieg M. Daily monitoring of nucleated red blood cells in the blood of surgical intensive care patients. *Clinica Chimica Acta* 2006b; 366: 329-35.

Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S, Krieg M. Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: a prospective cohort study. *Critical Care* 2007; 11: R62.

Stachon A, Becker A, Kempf R, Holland-Letz T, Friese J, Krieg M. Re-evaluation of established risk scores by measurement of nucleated red blood cells in blood of surgical intensive care patients. *The Journal of Trauma* 2008; 65: 666-73.

Tavassoli M. Erythroblastemia. *The Western Journal of Medicine* 1975; 122: 194-8.

Ward HP, Holman J. The association of nucleated red cells in the peripheral smear with hypoxemia. *Annals of Internal Medicine* 1967; 67: 1190-4.

Yokose N, Ogata K, Dan K, Nomura T. Aplastic anemia with circulating erythroblasts. *International Journal of Hematology* 1994; 60: 111-7.

Zabolotzky S, Walker D. Peripheral Blood Smear. In: *Diagnostic Cytology and Hematology*, 4 edn. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, eds. St. Louis: Mosby,

Inc 2014: 457-88.

Zenker I, Hirschberger J. Kleintiere:Hämatologie für die Praxis. Spektrum
Tiermedizin Klein-und Heimtiere 2006: 5.

VIII. ANHANG

Tabelle 1: Vergleich der Mortalität von Normoblasten positiven und negativen Patienten. 9

Tabelle 2: In der Veterinärmedizin beschriebene SIRS Kriterien 13

Tabelle 3: Parameter, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ankunft in die ICU erhoben werden (KING et al., 2001b) 16

Tabelle 4: Parameter, die innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ankunft in die ICU erhoben werden (KING et al., 2001b) 18

Tabelle 5: Parameter des APPLE (HAYES et al., 2011) 19

IX. DANKSAGUNG

Ganz herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Wess und Herrn Dr. René Dörfelt für die Bereitstellung des Themas, sowie die konstruktive Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation.

Ein Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann für die Möglichkeit, an Ihrem Lehrstuhl meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Reto Neiger für die große Hilfe bei statischen Fragen.

Dankeschön an Lena Hamacher sowie an das gesamte Team der Medizinischen Kleintierklinik für die Unterstützung bei den Probenentnahmen.

Danke an meine gesamte Familie und Freunde (vor allem Katja, Sopha, Sellyn, Lisi) für ihre aufmunternden Worte und ein großes Dankeschön an meinen Papa, der das Korrekturlesen übernommen hat.

Von ganzen Herzen möchte ich mich bei meiner Mama bedanken, ohne deren Unterstützung diese Dissertation, so wie ganz vieles in meinem Leben, nicht möglich gewesen wäre.

Vor allem aber möchte ich mich bei Georg bedanken, der mich, wie schon so oft auch in dieser Zeit großartig unterstützt hat und mich immer wieder erkennen lässt was wirklich wichtig ist im Leben und den ich über alles liebe.